



Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Mestrado Integrado em Medicina

2016

Trabalho Final de Mestrado

Transplante de Mucosa Olfativa no contexto de Lesão Medular

Rita Pereira da Silva de Medeiros – 12702 – 6º ano

Trabalho orientado por *Professor Doutor Marco Simão*

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

Hospital de Santa Maria

Transplante de Mucosa Olfativa no contexto de Lesão Medular

Revisão

Trabalho Final de Mestrado

Métodos de Revisão

Esta revisão reúne informação patente em vinte e cinco (25) artigos, publicados entre 2006 e 2016, disponíveis em *PUBMED.com* através da pesquisa das palavras-chave: *Olfactory mucosa; Olfactory Ensheathing Cells; Olfactory Mesenchymal Stem Cells; Transplant; Spinal cord injury.*

Resumo

A lesão traumática da medula espinal é uma das condições mais devastadoras para o ser humano. Após uma lesão deste tipo, o processo patofisiológico compreende não só a perda de conexões funcionais, mas também a inflamação, necrose hemorrágica progressiva e desmielinização, culminando numa morte celular progressiva.

A ausência de regeneração axonal direcionada e o ambiente inibitório criado pela cicatriz fibroglial, torna a “auto-reparação” do dano do sistema nervoso central (SNC) muito limitada, resultando na perda permanente de função.

Nos últimos anos, vários estudos apontaram o transplante neuronal como uma estratégia promissora para o tratamento da lesão medular crónica traumática.

Considerando fontes autólogas de células, a mucosa olfativa é a única porção do sistema nervoso com capacidade vitalícia de auto-regeneração, o que motivou inúmeros estudos em torno da aplicação desta unidade estrutural no contexto de lesão medular. Destaca-se o estudo pioneiro português de 2006, em que o professor Carlos Lima e a sua equipa publicaram resultados promissores na sequência do transplante autólogo de mucosa olfativa em sete pacientes, todos eles portadores de lesão medular crónica completa secundária a um acidente de viação. Em 2016 Watsuki e a sua equipa repetiram o protocolo, corroborando os resultados obtidos 10 anos antes e reforçando que a estratégia é segura, viável e potencialmente benéfica.

Por oposição ao transplante de mucosa olfativa, que envolve a implantação de toda a unidade estrutural e por isso inclui vários tipos de células, a estratégia de transplante

celular implica a seleção e isolamento de tipos celulares específicos. Neste contexto foram estudadas células de diferentes origens.

As células estaminais basais com origem na mucosa olfativa são responsáveis por repor as populações celulares perdidas num tecido que se encontra num estado de *turnover* contínuo. Elas apresentam várias propriedades e vantagens relativamente às células estaminais com outras origens, o que incitou o interesse no contexto de lesão medular.

De igual modo a células embainhantes dos axónios olfativos – células gliais especializadas que formam o “meio” de promoção e orientação do crescimento, mereceram a atenção por parte da comunidade científica.

No entanto, o transplante de um único tipo de células parece não ser suficiente para conseguir a efetiva regeneração axonal e recuperação funcional. O que se propõe atualmente é uma estratégia de co-transplantação de células que use células estaminais olfativas como “sementes” e células gliais especializadas como “solo”

Inevitavelmente colocam-se frente a frente ambas as opções terapêuticas expostas, na procura da estratégia mais eficaz: transplante de mucosa olfativa ou transplante celular? Seria precipitado responder a esta pergunta optando por uma das soluções terapêuticas como potencialmente mais benéfica. A resposta certa passa por uma investigação que procure alcançar soluções para as limitações e riscos que as atuais propostas apresentam, permanecendo alerta para sugestões alternativas que o avanço da ciência possa trazer.

Palavras-chave

Mucosa Olfativa; Células embainhantes dos axónios olfativos (*Olfactory ensheathing cells* - OEC's) Células estaminais basais da mucosa olfativa (*Olfactory mucosa mesenchymal stem cells* – OM-MSCs); Transplante; Lesão Medular.

Abstract

The traumatic spinal cord injury is one of the most devastating conditions for the human being. After a lesion of this kind, the pathophysiological process comprises not only the loss of functional connections, but also inflammation, necrosis and haemorrhagic progressive demyelination, resulting in progressive cell death.

The absence of oriented axon regeneration and the inhibitory environment created by the fibroglial scar makes "self-repairing" of the central nervous system damage (CNS) very limited, resulting in permanent loss of function.

In the last years, many studies showed neuronal transplantation as a promising strategy for the treatment of chronic traumatic spinal cord injury.

Considering autologous cell sources, the olfactory mucosa is the only portion of the nervous system with a lifetime capacity for self-regeneration, which led to numerous studies on the application of this structural unit in the context of spinal cord injury. Noteworthy is the pioneering portuguese study of 2006, where Professor Carlos Lima and his team have published promising results following the autologous tarsnplant of olfactory mucosa in seven patients, all of them with complete chronic spinal cord injury secondary to a road accident. In 2016, Watsuki and his team repeated the protocol, corroborating the results obtained 10 years before and reinforcing the idea that this is safe, feasible and potentially beneficial strategy.

In contrast to the olfactory mucosa transplant which requires the implantation of the entire structural unit, and thus includes various types of cells, the cell transplant strategy involves selection and isolation of specific cell types. In this context cells from different sources have been studied.

The basal stem cells from the olfactory mucosa are responsible for resetting lost cell populations in a tissue that is in a continuous turnover state. They have several properties and advantages over stem cells from other sources which motivated the study of its applicability in the treatment of spinal cord injury.

Similarly the olfactory ensheating cells - the specialized glial cells that form the permissive environment for regeneration and growth orientation of the newly formed axons, deserved attention by the scientific community.

However, the transplantation of a single type of cells seems not to be sufficient to achieve effective axonal regeneration and functional recovery. What is now proposed is a strategy of co-transplantation of cells that use olfactory stem cells as "seeds" and specialized glial cells as "breeding ground".

Inevitably, we place face to face both the exposed therapeutic options in the search for more effective strategy: olfactory mucosa transplant or cell transplant? It would be precipitated to answer this question by choosing one of the therapeutic solutions as potentially more beneficial. The right answer supports an investigation path that seeks to provide solutions to the limitations and risks presented by the current proposals, remaining alert to alternative suggestions that the advance of science might bring.

Key - words

Olfactory Mucosa; *Olfactory Ensheating Cells* - OEC's; *Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cells* – OM-MSCs; Transplant; Spinal Cord Injury.

Índice

Introdução	6
A Patofisiologia da Lesão Medular	8
A Natureza da Mucosa Olfativa	10
A Constituição	10
As Propriedades Regenerativas	14
O Transplante de Mucosa Olfativa no Tratamento da Lesão Medular	18
O Procedimento	18
Os Resultados	19
Riscos e Desafios	20
O Transplante Celular no Tratamento da Lesão Medular	21
Transplante de Mucosa Olfativa vs. Transplante Celular	25
Conclusão	27
Agradecimentos	28
Bibliografia	29
Anexos	32

Introdução

Os nervos seccionados, tanto a nível periférico como da medula espinal e cérebro, têm a capacidade de regenerar profusamente na região da lesão. No entanto, falham em reestabelecer o trajeto original de forma a atingir o seu destino, por um lado, por ausência de propriedades intrínsecas que promovam esse crescimento neuronal direcionado, por outro, pela existência de fatores externos impeditivos, entre os quais está a cicatriz fibroglial consequente à lesão (*Raisman, 2007*).

A “**lesão primária**” - compressão real ou seccionamento da medula espinal, inicia uma cascata de eventos celulares e moleculares geralmente referidos como “**lesão secundária**”, que envolve a infiltração de macrófagos, a reatividade de células gliais, a necrose do tecido e a formação de cavidades císticas (*Franssen et al., 2007*).

Durante os últimos 20 anos, verificou-se um enorme progresso da pesquisa na área das neurociências, não só ao nível do diagnóstico mas também da abordagem terapêutica da lesão medular. Existem vários métodos de abordagem, nomeadamente a **nível farmacológico** – sendo a metilprednisolona o único agente aceite e em torno do qual se levanta grande controvérsia; e a **nível cirúrgico** - através da descompressão do canal medular. No entanto, estes métodos dificilmente alcançam alguma melhoria (*Ge et al., 2015*).

Dado este panorama, pôs-se então a hipótese de que o transplante de tecido nervoso embrionário para as áreas lesionadas pudesse transferir consigo as propriedades que lhe permitem estabelecer um trajeto preciso. No entanto, não foram obtidos resultados satisfatórios. Já o transplante de fragmentos de nervo periférico ou células de Schwann mostrou-se promissor, permitindo o crescimento direcionado das fibras seccionadas. Isto sublinhou a importância do meio envolvente na regeneração axonal. Ainda assim verificou-se que, apesar de promoverem o crescimento orientado das fibras nervosas, esse crescimento parava no fim do transplante, não restabelecendo o contacto através da cicatriz glial e impedindo a recuperação da função.

Na década de 1970, com o advento das técnicas de marcação e identificação de células em divisão, reconheceu-se a **mucosa olfativa** como uma porção do sistema nervoso adulto no qual as células estão num estado de turnover contínuo, existindo **células estaminais basais** (*olfactory mucosa mesenchymal stem cells* – OM-MSCs)

responsáveis por repor as populações perdidas.

Uma vez que as células nervosas da mucosa olfativa enviam as suas fibras através da base do crânio para o bulbo olfativo no cérebro, conclui-se que essas fibras nervosas são capazes de regenerar ao longo da totalidade do seu percurso, e atingir o seu destino no sistema nervoso central, garantindo a sua funcionalidade.

As células gliais que compõem o percurso ao longo do qual as fibras nervosas olfativas “viajam” chamam-se **células embainhantes dos axónios olfativos** (*olfactory ensheathing cells* – OECs). Elas formam o “meio” de promoção e orientação do crescimento, tendo merecido a atenção por parte da comunidade científica (*Raisman, 2007*).

Desta forma, vários estudos se debruçaram no transplante destas estruturas, ambicionando transferir as propriedades que lhes estão anexadas para o contexto da lesão medular traumática crónica. Estas ambições foram inteiramente justificadas sendo este, atualmente, um dos caminhos mais promissores para reparação de lesão da medula espinal humana.

A Patofisiologia da Lesão Medular

A natureza complexa, reativa, e muitas vezes multifocal da lesão da medula espinal apresenta vários desafios clínicos que devem ser superados antes de podermos considerar estes tratamentos de transplantação uma realidade clínica.

Em particular, quando o trauma é a origem desta lesão, o processo patofisiológico compreende não só a **perda de conexões funcionais (desnervação)**, mas também a **inflamação, necrose hemorrágica progressiva e desmielinização**, culminando numa **morte celular progressiva**.

Na **fase mais precoce/ aguda** da lesão medular traumática, dá-se a destruição vascular, a perda de neurônios dentro da massa cinzenta, e a perda de oligodendrócitos mielinizantes na substância branca.

A morte celular que resulta do insulto traumático é ainda amplificada por excitotoxicidade – um processo que resulta da acumulação de moléculas excitatórias, como o glutamato, no fluido extracelular, e que conduz a maior ativação dos neuroreceptores. Elevados níveis de cálcio entram então na célula e ativam enzimas que vão danificar as estruturas celulares. Este dano celular conduz frequentemente à morte celular induzida (apoptose) e à oxidação de lípidos mediada por radicais livres.

Assim, durante os primeiros dias após a lesão há muitas características prejudiciais à sobrevivência e integração de células transplantadas.

A **inflamação** desempenha um papel em ambas as fases, inicial e crónica, da lesão medular. Os macrófagos, neutrófilos e células T migram a partir da circulação periférica, tornando-se ativos. A microglia (normalmente residente na medula) também é ativada, e tanto a microglia como os macrófagos removem as células mortas e detritos através de fagocitose.

A **desmielinização** crónica e progressiva é uma característica persistente da lesão medular. A resposta dos astrócitos começa imediatamente após a lesão (proliferaram, hipertrofiaram, etc.) e evolui ao longo do tempo. Os astrócitos reativos produzem componentes de matriz extracelular que acabam por formar uma cavidade encapsulada pela cicatriz, muito maior do que a lesão inicial. A **cicatriz glial** forma uma barreira física e um ambiente inibitório para a regeneração axonal e remielinização.

Assim, e para que as terapêuticas celulares sejam eficazes no contexto de lesão medular,

o transplante terá de ser feito durante uma **breve janela terapêutica**: teoricamente a seguir à resposta aguda, e antes da formação da cicatriz glial (*Coutts & Keirstead, 2008*).

A Natureza da Mucosa Olfativa

Considerando fontes autólogas de células, a mucosa olfativa é a única porção do sistema nervoso com capacidade vitalícia de auto-regeneração, o que motivou inúmeros estudos em torno desta unidade estrutural. Desta forma, o transplante de mucosa olfativa provou ter várias potenciais vantagens:

- Trata-se de um tecido com **características embrionárias** que lhe conferem a supra referida capacidade de se auto-regenerar – esta propriedade permite extrair parte da mucosa olfativa sem danificar permanentemente o olfato;
- É **facilmente acessível** através de técnicas pouco invasivas;
- Ao implantar mucosa ao nível da cavidade da medula espinal, usamos tecido sólido e não uma suspensão de células, **diminuído o risco de células individuais entrarem na circulação** de líquido céfalo-raquidiano (LCR);
- O transplante de mucosa olfativa **evita o ambiente artificial de uma cultura** de tecidos, o que também reduz os riscos do procedimento. Em vez disso, os enxertos de mucosa olfativa preservam o meio ambiente do LCR, já que este também banha a mucosa olfativa através da via olfativa de drenagem;
- O enxerto autólogo **não é uma carga adicional para o sistema imunitário**, evitando problemas de rejeição, crescimento desregulado, transmissão de doenças ou problemas éticos (*Lima et al., 2006*).

Considerando o transplante de mucosa olfativa no contexto de lesão medular traumática, importará rever a sua **constituição** e conhecer as **propriedades regenerativas** que a tornam relevante neste âmbito.

A Constituição

A mucosa olfativa humana encontra-se na região posterior, superior e medial da cavidade nasal, consistindo num **epitélio colunar pseudo-estratificado** que repousa sobre uma **lâmina própria** altamente celular.

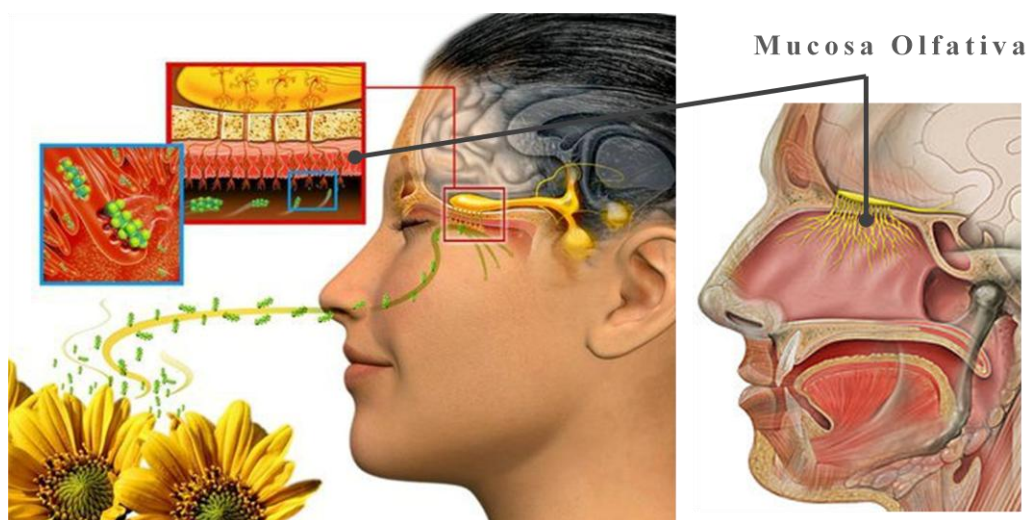


Figura 1 - Localização da Mucosa Olfativa.¹

O epitélio é constituído por **4 tipos de células**: as células olfativas bipolares recetoras, as células de sustentação, as células microvilares e as células basais.

A **célula olfativa recetora** é um neurónio bipolar que projeta uma única dendrite para a superfície do neuroepitélio olfativo e um único axónio para o bulbo olfativo.

Os núcleos dos neurónios bipolares dispõem-se a todos os níveis da espessura do epitélio, estando os núcleos das células mais velhas mais próximos da superfície do epitélio do que os núcleos das células mais recentemente diferenciadas. A disposição variável dos núcleos confere a este epitélio o aspeto típico pseudo-estratificado.

A dendrite do neurónio olfativo tem na sua terminação a vesícula olfativa, que se projeta na superfície epitelial, contendo cílios imóveis com recetores de membrana aos quais as moléculas odoríferas se ligam.

Cada um dos axónios das 6 a 20 milhões de células bipolares atravessa a membrana basal em direção à lâmina própria, reúne-se para formar fascículos e nervos passando através dos 15 a 20 orifícios de cada uma das lâminas crivosas para ir formar uma sinapse no interior do bulbo olfativo.

Vários marcadores neuronais são conhecidos para **identificar neurónios maduros e imaturos**.

Neurónios imaturos podem ser reconhecidos pela expressão de moléculas como a fosfoproteína associada ao crescimento **GAP43** - a forma embrionária da molécula de adesão celular neural (N-CAM), e a proteína associada a membrana - **SCG10**, ambas envolvidas no crescimento axonal.

Os **neurónios maduros** podem ser identificados pela expressão de proteína marcadora olfativa (**OMP**) e de **N-CAM**.
(Franssen et al., 2007)

¹ Imagens acessíveis em “https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Head_olfactory_nerve.jpg” e “<http://aromavera.blogspot.pt/2012/04/aromaterapia-perfeicao-humana-vista.html>”;

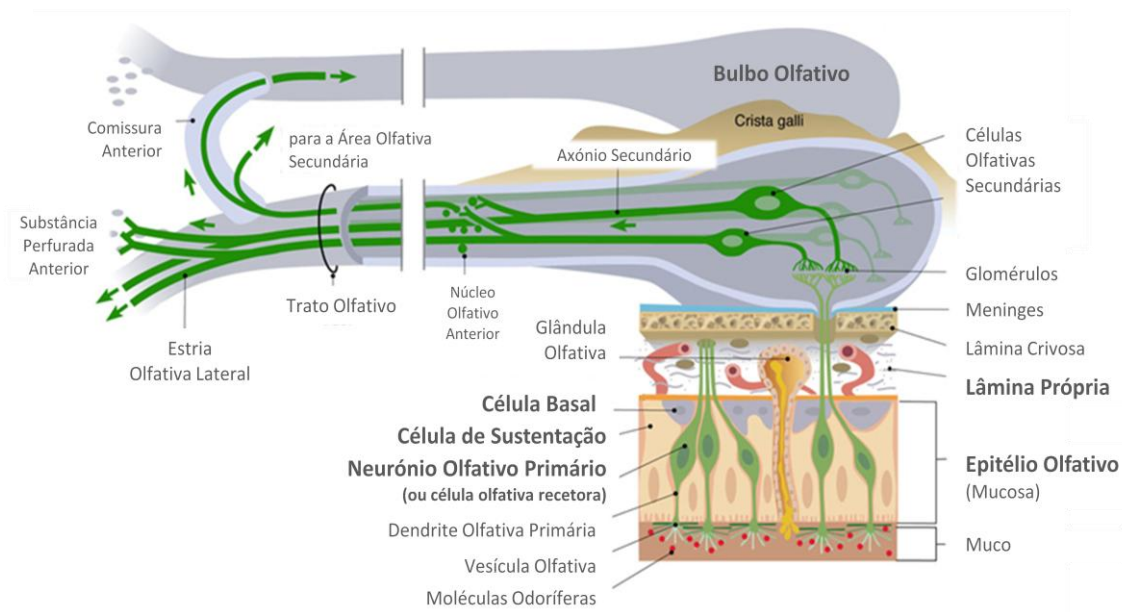


Figura 2 – Epitélio, Bulbo e Tratos Olfativos.²

As **células de sustentação**, que são o tipo celular predominante no neuroepitélio olfativo, circundam as células bipolares, contribuindo para a regulação e a manutenção do meio iônico favorável à ocorrência da transdução olfativa.

As **células microvilares**, apenas identificáveis por microscopia eletrônica, foram admitidas como uma segunda classe, morfológicamente distinta, de células recetoras da mucosa olfativa. No entanto, o seu papel ainda não está totalmente esclarecido.

As **células basais** são o único tipo de células do epitélio olfativo que não se projeta na superfície epitelial, repousando sobre a membrana basal. Constituem uma população distinta de células estaminais (OM-MSCs), capazes de regenerar continuamente, ao longo da vida, as células olfativas danificadas. Por serem multipotentes, elas repõem não só as células neurais, mas também as não neurais, como, por exemplo, as células de suporte. É durante este processo de diferenciação que as células migram das camadas basais para a porção mais apical do epitélio.

Imediatamente abaixo do epitélio olfativo encontramos a **lâmina própria**, constituída por fascículos de axônios, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e glândulas de Bowman (que secretam produtos essenciais à transdução olfativa).

² Imagem acessível em “<https://bmc.med.utoronto.ca/cranialnerves/illustrations-by-chapter/olfactory-i>”.

Os axónios dos neurónios olfativos são envolvidos, na sua transição do sistema nervoso periférico (neuroepitélio olfativo) para o sistema nervoso central (bulbo olfativo) por uma linhagem única de células gliais que os guiam através da lâmina crivosa para o bulbo: são as **células embainhantes dos axónios olfativos** (“*olfactory ensheathing cells*” - OEC) (Escada, 2010).

O **bulbo olfativo** é constituído por várias camadas de células: a camada de fibras nervosas do nervo olfativo (ONL), a camada glomerular, a camada plexiforme externa, a camada de células mitrais, a camada plexiforme interna e a camada de células granulares.

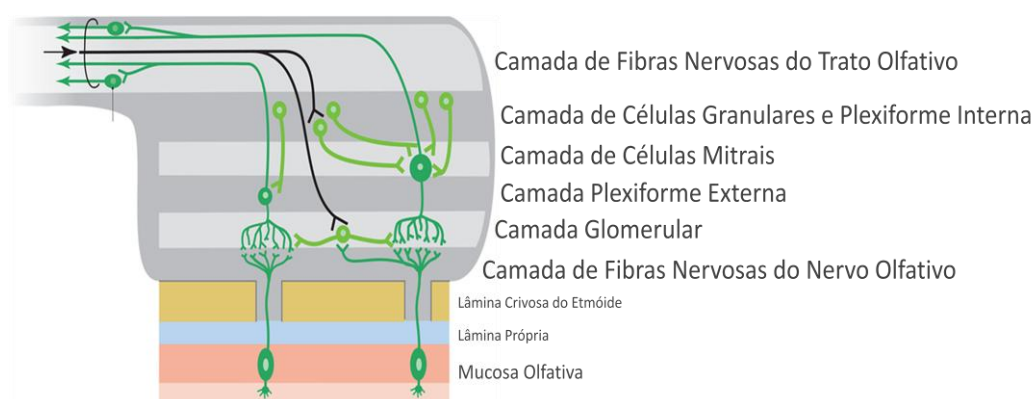


Figura 3 - Bulbo Olfativo - A organização por camadas.³

Os axónios olfativos primários entram no bulbo através da ONL e sinapsam com as dendrites das células tufadas e mitrais ao nível dos glomérulos. Os glomérulos são compostos por uma rede de terminações nervosas e conexões sinápticas, interligados por neurónios justaglomerulares.

Os neurónios mitrais e tufados projetam-se depois para o córtex olfativo através do trato olfativo lateral.

A conectividade entre o epitélio e o bulbo baseia-se numa projeção zona-a-zona. Os fascículos nervosos consistem em milhares de axónios embalados, com origem em neurónios olfativos primários que expressam diferentes recetores olfativos (OR). Assim que estes fascículos penetram na ONL, “desfasciculam” e formam novos arranjos com axónios que expressam o mesmo gene OR. Os novos pacotes de axónios, que expressam o mesmo recetor, destinam-se apenas a um determinado tipo de glomérulos (Franssen et al., 2007).

³ Imagem acessível em “<https://bmc.med.utoronto.ca/cranialnerves/illustrations-by-chapter/olfactory-i>”.

As Propriedades Regenerativas

O **tempo médio de vida** dos neurónios olfativos primários é de cerca de **1 mês**. Os neurónios em degeneração são substituídos por novos neurónios derivados da população de **células basais estaminais (OM-MSCs)**.

Este processo de neurogénese é significativamente aumentado quando os neurónios olfativos primários são perdidos face, por exemplo, a uma lesão traumática.

Experiências preliminares revelaram desde cedo que os **neurónios olfativos primários dependem da existência do seu alvo para sobreviver** – ou seja, em caso de bulbectomia o crescimento/regeneração não é eficaz, provavelmente por existir algum suporte trófico vital a esse nível.

Verificou-se também que, em áreas em que a **camada basal** esteja danificada não ocorre a recuperação e reconstituição do epitélio olfativo ao passo que se essa camada de células progenitoras for poupada a regeneração é completa (*Franssen et al., 2007*).

Após a lesão, o principal processo a ter lugar no epitélio olfativo é a apoptose dos neurónios danificados e consequente resposta do sistema imunitário, que inclui uma infiltração massiva por macrófagos que fagocitam as células mortas. Dá-se depois a proliferação e diferenciação das células basais.

Distinguem-se **duas fases de regeneração axonal**: na **primeira fase**, os axónios crescem do epitélio olfativo através da lâmina própria e da camada de fibras nervosas (ONL) para o bulbo olfativo; na **segunda fase** dá-se o “direcionamento” axonal, em que é restaurado o *mapa espacial* através da reinervação dos glomérulos

correspondentes. Este processo demora cerca de 8 semanas e requer inúmeros sinais moleculares na sua regulação.

Ainda que não esteja totalmente esclarecido, reconhece-se a importância de vários fatores no processo de **neurogénese olfativa**:

- **Fatores de transcrição**, envolvidos na regulação da neurogénese geral durante o desenvolvimento, são expressos durante a neurogénese olfativa secundária a lesões no epitélio maduro. Estes fatores de transcrição incluem *Mash 1*, o *Lhx2*, a *neurogenina 1*, entre outros.
- Os **fatores de crescimento** são igualmente críticos na regulação desta primeira fase de regeneração axonal. Estas moléculas e os seus recetores são expressas ao nível do epitélio olfativo, promovendo a proliferação e diferenciação das células progenitoras.

Além de moduladores positivos da neurogénese, os fatores de

crescimento funcionam como reguladores negativos, inibindo o processo quando este deve cessar. São exemplos os membros da superfamília do fator transformador de crescimento β (TGF β).

- Os **neuropéptidos** também desempenham um papel fundamental nesta regulação. São exemplos o neuropéptido Y (NPY) – um promotor da neurogénese expresso pelas células de sustentação; e o polipéptido hipofisário ativador da adenilciclase (PACAP) – um fator de proliferação e sobrevivência para os neurónios olfativos, expresso pelas células basais.

Depois da neurogénese, entramos na segunda fase da regeneração axonal, em que é restabelecida a conexão do epitélio com o bulbo olfativo de acordo com o *mapa espacial*.

Experiências prévias indicam que o **recetor olfativo** (RO) expresso por um dado neurónio tem um papel fundamental no seu direcionamento para um determinado glomérulo. No entanto, estes não são os únicos orientadores:

- As **moléculas de adesão celular** (como determinados membros da família das caderinas e cateninas) também contribuem para a ligação dos axónios de uma dada zona do epitélio a uma zona específica do bulbo.
- Determinados **genes**, como o do receptor Alk6 BMP-tipo I, o da neuropilina-2, o da enzima sintetizadora de ácido retinóico 2 (RALDH2), mostram também um padrão de expressão espacial no epitélio que se correlaciona com a expressão de RO, estando provavelmente envolvidos no estabelecimento de projeções zonais corretas.
- De forma mais específica, sabe-se ainda que a **efrina A3** e a **A5** estão associadas à expressão de um determinado tipo de OR, direcionando esses neurónios para a zona ventral do bulbo.
- Já a **proteína receptora neuropilina 1** (NP1), e o seu ligando – a proteína Sema3A, orientam os neurónios para a região rostrolateral e caudomedial do bulbo.

Além deste controlo epitelial, as **células gliais** assumem um papel de particular importância no processo de regeneração axonal. As já referidas **células embainhantes dos axónios olfativos (OECs)** são um tipo especializado de glia que funciona como substrato permissivo do crescimento para os novos axónios,

As OECs eram inicialmente referidas como **células de Schwann** dos nervos olfativos, uma designação que revela a sua semelhança, apesar das diferenças lhes conferirem um fenótipo único, promotor da regeneração axonal (*Richter & Roskams, 2008*).

servindo de guia que os orienta desde o neuroepitélio na cavidade nasal até ao cérebro.

Também elas secretam vários fatores promotores da regeneração:

- **Neurotrofinas** como o fator de crescimento nervoso (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) ou o fator neurotrófico derivado das células gliais (GDNF);
- **Moléculas de adesão celular** como N-CAM, provavelmente envolvidas na adesão glia-axónios.
- **Moléculas da matriz extra-celular** (ECM) como a laminina, a fibronectina e o fibrogénio tipo IV (*Franssen et al., 2007*).

Dado o destaque que as OEC revelaram ter no crescimento e orientação dos axónios olfativos recém-formados, vários estudos examinaram a capacidade destas células para promover a regeneração axonal ao nível do SNC lesionado.

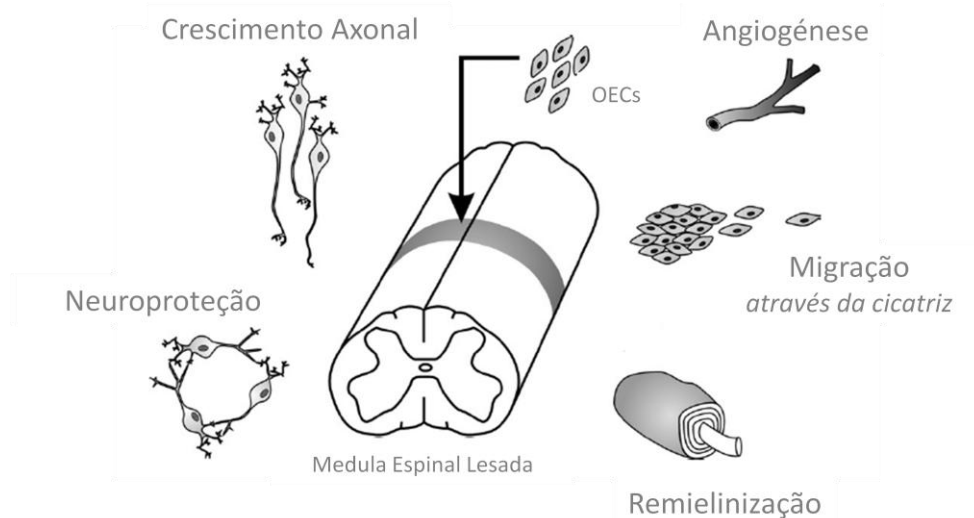


Figura 4 – As 5 propriedades das OECs. (*Franssen et al., 2007*).

Em geral, são relatados cinco efeitos benéficos das OEC, todos eles contribuindo para uma maior **recuperação funcional** (*Novikova, Lobov, Wiberg, & Novikov, 2011*). Estes efeitos são ilustrados na *Figura 4* e incluem: (1) estimulação do **crescimento** axonal, (2) **proteção** axonal e tecidual, (3) capacidade de migrar do local da lesão **através do tecido da cicatriz formando uma ponte** que permite o crescimento dos novos axónios, (4) promoção da **angiogénese** e (5) **remielinização** dos axónios da medula espinhal. (*Richter & Roskams, 2008*)

No entanto, é de referir que o domínio destas propriedades difere de acordo com a origem das OECs no bulbo (OB-OECs) ou na mucosa olfativa (OM-OECs): estas últimas são capazes de regular o processo inflamatório e a formação de matriz extracelular, mas têm baixo potencial de regeneração. Já as primeiras facilitam a recuperação funcional induzindo o crescimento axonal (*Paviot et al., 2011*).

O Transplante de Mucosa Olfativa no Tratamento da Lesão Medular

A natureza da mucosa olfativa permitiu equacionar a sua utilização no tratamento da lesão medular crónica traumática. A utilização deste tecido na sua totalidade, ou dos seus constituintes isoladamente, foi alvo de vários estudos, sumarizados na *Tabela 1*.

Autor, Ano	Nome do Estudo	Enxerto	Combinação	Efeito funcional	Outros resultados
Lu et al., 2001	Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats	Lâmina própria (LP)	-	Melhoria	-
Richter et al., 2005	Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord	LP	OEC	-	Aumento da angiogénese
Lima et al., 2006	Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study	Mucosa olfativa (MO)	-	Melhoria parcial	-
Iwatsuki et al., 2008	Transplantation of olfactory mucosa following spinal cord injury promotes recovery in rats	LP olfativa e respiratória	-	Melhoria parcial	Melhoria com LPO comparada com LPR
Chhabra et al., 2009	Autologous olfactory [corrected] mucosal transplant in chronic spinal cord injury: an Indian pilot study	MO	-	Melhoria parcial	-
Lima et al., 2010	Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury	MO	-	Melhoria parcial	-
Aoki et al., 2010	Limited functional recovery in rats with complete spinal cord injury after transplantation of whole-layer olfactory mucosa: laboratory investigation	MO	-	Melhoria parcial	-
Iwatsuki, 2011	Olfactory mucosa transplantation for spinal cord injury	MO	-	Melhoria	-
Zhang et al., 2011	Scar ablation combined with LP/OEC transplantation promotes anatomical recovery and P0-positive myelination in chronically contused spinal cord of rats	LP	OEC	Melhoria parcial	Reparação tecidual; sem recuperação funcional significativa.
Centenaro et al., 2013	Implications of olfactory lamina propria transplantation on hyperreflexia and myelinated fiber regeneration in rats with complete spinal cord transection	LPO e LPR	-	Melhoria parcial	-
Moriwaki et al., 2014	Presence of trans-synaptic neurons derived from olfactory mucosa transplanted after spinal cord injury	MO	-	Melhoria parcial	-
Dlouhy et al., 2014	Autograft-derived spinal cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient	MO	-	-	Primeiro relato de uma massa secundária ao transplante de MO
Goni et al., 2014	Safety profile, feasibility and early clinical outcome of cotransplantation of olfactory mucosa and bone marrow stem cells in chronic spinal cord injury patients	MO	BMSCs	Melhoria parcial	-
Wang et al., 2015	Safety profile, feasibility and early clinical outcome of co-transplantation of olfactory mucosa and bone marrow stem cells in chronic spinal cord injury patients	LP	-	Melhoria parcial	Sem efeitos benéficos significativos
Watsuki et al., 2016	A pilot clinical study of olfactory mucosa autograft for chronic complete spinal cord injury	MO	-	Melhoria	-

Tabela 1 – Transplante de Mucosa Olfativa no contexto da Lesão Medular – Revisão da literatura (*Ge et al., 2015*).

Destaca-se o estudo pioneiro português de 2006, em que o professor Carlos Lima e a sua equipa publicaram resultados promissores na sequência do transplante autólogo de mucosa olfativa em sete pacientes, todos eles portadores de lesão medular crónica completa secundária a um acidente de viação. Em 2016 Watsuki e a sua equipa repetiram o protocolo, corroborando os resultados obtidos 10 anos antes.

O Procedimento

O procedimento é composto por **três momentos**:

O **primeiro passo** é a recolha de mucosa olfativa, executado por um cirurgião Otorrinolaringologista – a abordagem é feita por endoscopia transnasal, sendo

recolhido tecido da porção postero-superior do septo da cavidade nasal. É realizada análise microbiológica antes e durante a operação (antes da implementação do tecido na medula).

O **segundo passo** é executado por um neurocirurgião – a medula espinal lesionada é exposta, o tecido de cicatrização da lesão é removido de modo a não danificar os tecidos conservados e expondo o tecido nervoso viável em ambas as extremidades.

O **último passo** envolve a transplantação da mucosa olfativa. Antes da implantação, o tecido da mucosa é embebido em LCR e cortado em pequenos pedaços para aumentar a superfície de contacto.

Os pacientes selecionados sofreram lesão medular **mais de 12 meses antes** e estavam **cronicamente paraplégicos**, com as seguintes características:

- Completa falta de função motora e sensorial abaixo do nível da lesão ou com alguma sensação abaixo do nível da lesão (ASIA A ou B);
- Idade entre os **16 e 40 anos**;
- Lesão medular ≤ 3 cm;
- Ausência de patologia nasal ou dos seios paranasais;
- Ausência de outras patologias graves, nomeadamente a nível respiratório, neurológico ou psicológico.

(Watsuki et al., 2016)

De referir que todos os pacientes foram sujeitos a **reabilitação física pré e pós cirúrgica**. A reabilitação incluiu estratégias padrão de fisioterapia para estimular a função motora ao nível da lesão e abaixo da mesma. Após a reabilitação pré-cirúrgica de oito semanas, os scores foram avaliados sem registo de melhoria – considerou-se que estes doentes tinham uma lesão medular crónica completa.

Os Resultados

São usados vários parâmetros para quantificar a eficácia destas intervenções: a

ASIA Impairment (AIS) Scale

- ☐ **A = Complete.** No sensory or motor function is preserved in the sacral segments S4-S5.
- ☐ **B = Sensory Incomplete.** Sensory but not motor function is preserved below the neurological level and includes the sacral segments S4-S5 (light touch, pin prick at S4-S5; or deep anal pressure (DAP)), AND no motor function is preserved more than three levels below the motor level on either side of the body.
- ☐ **C = Motor Incomplete.** Motor function is preserved below the neurological level**, and more than half of key muscle functions below the single neurological level of injury (NLI) have a muscle grade less than 3 (Grades 0-2).
- ☐ **D = Motor Incomplete.** Motor function is preserved below the neurological level**, and at least half (half or more) of key muscle functions below the NLI have a muscle grade ≥ 3 .
- ☐ **E = Normal.** If sensation and motor function as tested with the ISNCSCI are graded as normal in all segments, and the patient had prior deficits, then the AIS grade is E. Someone without an initial SCI does not receive an AIS grade.

melhoria no score obtido na classificação da Associação Americana de Lesão Medular (**ASIA Impairment Scale** e **ASIA Motor Scale** – ver *Figura 5* e *Anexo 1*), o eletromiograma (**EMG**), os potenciais motores evocados (**MEP**); os potenciais somatossensoriais evocados (**SSEP**), a sensação vesical, etc.

Melhorias na marcha não foram conseguidas em doentes com este tipo de lesão com nenhum dos tratamentos propostos até à data. No entanto, o transplante autólogo de mucosa olfativa obteve resultados promissores em ambos os estudos

Figura 5 – ASIA Impairment Scale.

Watsuki e a sua equipa descreveram resultados significativos, com impacto na rotina dos seus doentes: todos eles apontaram melhorias no equilíbrio do tronco sendo consequentemente capazes de se manter sentados por períodos de tempo mais prolongados, lavar a cabeça sozinhos e até pressionar o botão do elevador. Alguns conseguiram mesmo mudar de posição na cama sem ajuda.

referidos. O treino contínuo e intensivo pós-cirúrgico desencadeou o movimento voluntário limitado e induziu a reconstrução também limitada de circuitos neurais severamente danificados pela lesão medular crónica completa. Watsuki e a sua equipa conseguiram mesmo, e pela primeira vez, reportar *PEMs* após um tratamento de lesão medular crónica completa, provando a recuperação parcial da condutividade eletrofisiológica (Watsuki *et al.*, 2016).

Riscos e Desafios

O risco potencial de **génese tumoral** é sempre um dos problemas que os cientistas e investigadores enfrentam. É essencial para o sucesso da transplantação *in vivo* que as células retenham a sua capacidade de regeneração neuronal sem formar uma massa tumoral.

De facto existe um relato recente do aparecimento de uma massa medular após o transplante de mucosa olfativa - uma mulher de 18 anos que sofreu uma lesão medular completa ao nível de T10-11 e que foi submetida a auto-transplante de mucosa olfativa, surge com dor nas costas 8 anos mais tarde; os métodos de imagem mostraram uma massa intramedular que exigia ressecção no local do transplante.

Achados intraoperatórios revelaram uma expansão da medula espinal com uma massa multicística contendo grandes quantidades de uma substância espessa, tipo muco. O exame histológico e a coloração imuno-histoquímica concluíram que o tumor era composto principalmente por cistos revestidos de epitélio respiratório (Dlouhy *et al.*, 2014).

Portanto, esta massa não continha mucosa olfativa mas sim mucosa respiratória, sem efeito a nível da regeneração neuronal. Este facto atenua o risco ao nível do transplante de mucosa olfativa mas sublinha a possibilidade de **tecido indesejado poder ser implantado**. (Watsuki *et al.*, 2016).

Outra problemática é o “**timing**” do transplante – vários estudos mostraram que a transplantação precoce terá um resultado neurológico melhor. No entanto a janela de oportunidade ótima permanece por definir (Ge *et al.*, 2015).

O Transplante Celular no Tratamento da Lesão Medular

O transplante de mucosa olfativa envolve a implantação de toda a unidade estrutural que compõe o tecido, incluindo, desta forma, vários tipos de células. Por oposição, a estratégia de **transplante celular** implica a seleção e isolamento de tipos celulares específicos tendo sido estudadas, neste contexto, células de diferentes origens.

O **transplante de células estaminais** provou ter particular interesse no tratamento da lesão medular traumática, constituindo uma estratégia de reparação de danos e restituição de funções. Este método poderá ser capaz de reestabelecer a função por conseguir (1) suprimir a resposta inflamatória, (2) inibir a apoptose e necrose neuronal, (3) substituir os neurónios perdidos ou danificados, (4) promover a regeneração axonal e remielinização e (5) desempenhar outros papéis indiretos, tais como a promoção da neovascularização ou a constituição de um substrato que sustente a regeneração de células endógenas (*Coutts & Keirstead, 2008*).

As **células estaminais com origem na mucosa olfativa** (OM-MSCs), ou simplesmente células basais como atrás foram referidas, são células-tronco com características importantes: são multipotentes, originando células neurais e não neurais; têm ampla distribuição e localização vantajosa; evitam questões éticas e minimizam o risco de rejeição imunológica dado que se trata de um transplante autólogo; e não são suscetíveis a anomalia cromossómica ou génese tumoral.

Assim, as OM-MSCs poderão funcionar como verdadeiras "sementes" para a terapia de transplante celular neste contexto de lesão medular. Estas sementes têm uma plasticidade surpreendente, o que sugere que poderão ser moldadas pelo microambiente de forma a se diferenciarem em neurónios especializados e substituírem neurónios danificados.

As **OECs** também se mostraram candidatas promissoras para a terapêutica celular. Estas células têm a capacidade de moldar o microambiente: como já vimos, elas secretam vários fatores neurotróficos e expressam moléculas de adesão celular, criando um nicho

Quando comparadas com as células estaminais mesenquimais com origem na medula óssea (BM-MSCs), as **OM-MSCs** apresentam várias **vantagens**:

- Têm maior taxa de **proliferação**;
- Constituem uma **fonte estável**;
- A sua **potência** não é afetada pela idade do dador;
- Derivam da ectoderme (enquanto as MSC da medula óssea e tecido adiposo derivam da mesoderme) sendo mais fácil a sua **diferenciação** em células da linhagem neuronal (*Ge et al., 2015*).

que garante a neuroprotecção, a remielinização, a angiogénese e a promoção do crescimento local. Expressam igualmente metaloproteínases 2 e 9, o que as torna capazes de migrar e penetrar na matriz extracelular. Esta propriedade permite-lhes não só encaminhar os novos axónios através da cicatriz glial como reduzir a formação dessa mesma cicatriz.

Se nos referirmos à origem destas células, e compararmos as **OM-OECs** com as **OB-OECs** poderemos reconhecer algumas vantagens nas que derivam da mucosa olfativa: estão melhor localizadas; apresentam maior facilidade migratória; regulam processos inflamatórios e a formação de matriz extracelular; sobrevivem por um período de tempo maior após o transplante; apresentam um melhor ratio risco/benefício (Ge et al., 2015).

Assim o transplante autólogo de **OECs com origem na mucosa olfativa** (OM-OECs) foi também explorado em ensaios clínicos de lesão medular, mostrando ser uma estratégia segura e exequível, como antes foi referido e como podemos comprovar pelos estudos sumarizados na *Tabela 2*.

Autor, Ano	Nome do Estudo	Enxerto	Combinação	Efeito funcional	Outros resultados
Lu et al., 2001	Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats	OM-OECs	-	-	-
Ramer et al., 2004	Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury	OM-OECs	-	Melhoria	-
Feron et al., 2005	Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury	OM-OECs	-	Melhoria	-
Deng et al., 2006	Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord	OM-OECs	-	Melhoria	-
Toft et al., 2007	Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury	OM-OECs	-	Melhoria parcial	-
Deng et al., 2008	The co-transplantation of human bone marrow stromal cells and embryo olfactory ensheathing cells as a new approach to treat spinal cord injury in a rat model	OM-OECs	BMSCs	Melhoria	-
Mackay-Sim et al., 2008	Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial	OM-OECs	-	Melhoria	-
Bretzner et al., 2010	Combination of olfactory ensheathing cells with local versus systemic cAMP treatment after a cervical rubrospinal tract injury	OM-OECs	Infusão de cAMP + OECs	Melhoria	-
Gorrie et al., 2010	Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury	OM-OECs	-	Melhoria	-
Amemori et al., 2010	Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat	OM-OECs	OECs + MSCs	Melhoria parcial	Melhoria parcial dos PEMs
Stamegna et al., 2011	Nasal OEC transplantation promotes respiratory recovery in a subchronic rat model of cervical spinal cord contusion	OM-OECs	-	Melhoria	Melhoria na atividade do diafragma e nervo frénico
Centenaro et al., 2011	Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord respiratory lamina propria transplantation after spinal cord regeneration	OM-OECs	-	Sem melhoria	-
Zhang et al., 2011	Scar ablation combined with LP/OEC transplantation promotes ablation combined with LP/OEC transplantation promotes contused spinal cord of rats	OM-OECs	Ablação da cicatriz glial + OECs	Sem melhoria	Ativação das células de Schwann endógenas
Tharion et al., 2011	Motor recovery following olfactory ensheathing cell transplantation in rats with spinal cord injury	OM-OECs	-	Melhoria	Melhoria na recuperação motora
Rao et al., 2013	Clinical application of olfactory ensheathing cells in the treatment of spinal cord injury	OM-OECs	-	Melhoria	-
Silva et al., 2013	Combining adult stem cells and olfactory ensheathing cells: the secretome effect	OM-OECs	BMSCs, UMSCs e ASCs	Melhoria	OECs + ASC – combinação mais promissora
Tabakow et al., 2013	Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury	OM-OECs	-	Melhoria	-

Tabela 2 – Transplante Celular no contexto da Lesão Medular – Revisão da literatura (Ge et al., 2015).

No entanto, estes mesmos estudos apontam para o facto do transplante de um único tipo de células não ser suficiente para conseguir a efetiva regeneração axonal e recuperação funcional, já que cada tipo celular apresenta propriedades ímpares e necessárias (*ver caixa*).

Portanto, o que se propõe atualmente é uma estratégia de co-transplantação de células que use células estaminais olfativas como “sementes” e células gliais especializadas como “solo”, como ilustra a *Figura 6*.

Deng et al. (2008) relataram que a co-transplantação das MSCs com OECs, num modelo de rato, resultou em melhoria funcional mais efetiva do que qualquer um dos tipos de células isoladamente.

Silva et al. (2013) comprovaram que as OECs podiam promover a proliferação e a atividade metabólica das MSCs, mas que estas também teriam um efeito positivo no comportamento das OEC.

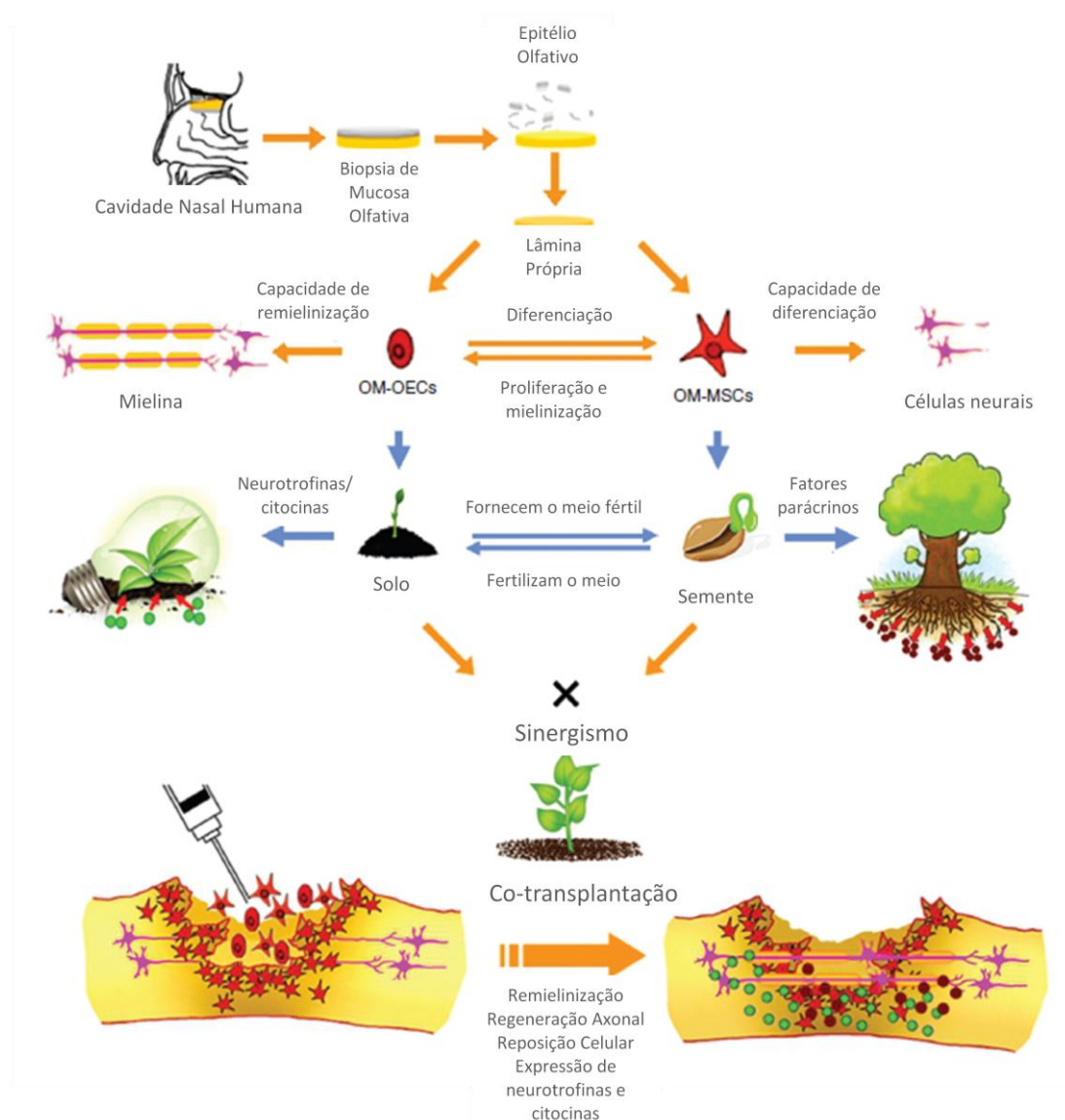


Figura 6 – Diagrama esquemático do co-transplante de OM-OECs e OM-MSCs – o Solo e as Sementes. (Ge et al., 2015)

O meio assim condicionado pelas OEC é capaz de induzir a diferenciação das OM-MSCs em neurónios, sendo que alguns desses terão propriedades eletrofisiológicas semelhantes aos neurónios normais. Mas as OM-MSCs também secretam fatores parácrinos que ativam células estaminais endógenas, reduzem a atividade inflamatória e induzem a angiogénese. São então capazes de influenciar igualmente o meio, com efeito direto sobre a proliferação de OEC e mielinização do SNC (*Lindsay et al., 2013*).

Assim, da mesma forma que as "sementes" são reguladas pelos "solos", as "sementes" podem mudar os "solos" e criar um ambiente que as beneficia. Este sinergismo reforça que a co-transplantação dos dois tipos de células é a melhor estratégia para o tratamento da lesão medular (*Ge et al., 2015*).

Transplante de Mucosa Olfativa vs. Transplante Celular

Inevitavelmente colocam-se frente a frente ambas as opções terapêuticas expostas, na procura da estratégia mais eficaz: transplante de mucosa olfativa ou transplante celular?

O valor da informação sobre **transplante autólogo de mucosa olfativa** que derivou dos estudos do professor Carlos Lima e dos seus colaboradores é inestimável. O seu trabalho pioneiro neste campo revelou que o tratamento é seguro, viável e potencialmente benéfico.

Contudo, e apesar dos resultados motivadores dos estudos de 2006 e 2010, bem como dos trabalhos de Watsuki et al. em 2016, continuam a surgir desafios que devem ser superados para alcançar uma nova realidade terapêutica.

Uma das questões eminentes refere-se ao facto de, nestes estudos, serem usados preparados de mucosa olfativa sem cultura ou purificação, o que sugere que uma população mista de células estaminais, neurónios e células gliais apresenta efeito terapêutico. Por um lado, isto impossibilita a atribuição de um dado efeito a um componente específico do tecido. Por outro, como as células não são isoladas ou enriquecidas, é possível que a reatividade dos diversos componentes tenha efeitos indesejados, nomeadamente o aparecimento de massas ectópicas.

Da mesma forma, os inúmeros estudos realizados no âmbito do **transplante celular** bem como as estratégias teoricamente propostas, revelam-se bastante promissores mas igualmente associados a questões que carecem de resposta antes de podermos considerar este método aplicável na prática clínica.

Uma das principais desvantagens associadas à implantação ou injeção de células isoladas é a limitada proporção de células viáveis que sobrevivem no local da lesão após o procedimento, já que tendem a migrar. Para alcançar uma regeneração funcional significativa da medula espinal será então necessário preencher os locais da lesão com células competentes e específicas para esse tecido, ou ativar células progenitoras neurais endógenas que substituam ou resgatem as células danificadas (*Ge et al., 2015*).

Outra dúvida que surge é se o transplante de células isoladas específicas, ainda que em combinação, terá as propriedades suficientes para suportar a regeneração axonal e

recuperação funcional robustas num ambiente complexo de lesão medular.

Dada a quantidade de interrogações que ainda há por elucidar seria precipitado responder à pergunta inicial optando por uma das soluções terapêuticas como potencialmente mais benéfica. A resposta certa passa por uma investigação que procure alcançar soluções para as limitações e riscos que as atuais propostas apresentam, permanecendo alerta para sugestões alternativas que o avanço da ciência possa trazer.

Conclusão

Não obstante aos desafios e questões que se colocam em torno destas propostas terapêuticas, é de notar e louvar o enorme progresso feito nos últimos anos no tratamento de uma condição que se considerava crónica e incurável. Hoje sabemos que:

- O transplante autólogo de mucosa olfativa para o local de lesão medular é seguro, exequível, e potencialmente eficaz;
- A mucosa olfativa constitui uma fonte autóloga de células com propriedades únicas. Destacam-se as células estaminais basais e as células gliais especializadas – OM-MSCs e OM-OECs, cujo co-transplante surge como forte candidato a estratégia terapêutica no contexto da lesão medular crónica traumática.

As propriedades das OEC melhoram significativamente quando modificadas para secretar NT3 - um membro da família das neurotrofinas, conhecida pelos seus efeitos benéficos na sobrevivência das células neuronais, neuroprotecção e crescimento. (Ma et al., 2010)

Mas a evolução continua em curso, aliando a investigação e a medicina, para nos apresentar constantemente novas propostas terapêuticas. Uma das soluções em atual desenvolvimento, por exemplo, prevê a combinação da neurotransplantação com a terapêutica genética (*ver caixa*). A engenharia genética poderá assim abrir novas possibilidades para aplicações clínicas futuras do transplante

no contexto de lesão medular traumática crónica.

Assim, é preciso continuar na busca de respostas, persistir na superação dos desafios e impulsionar o desvendar de novas técnicas para tornar realidade clínica o que outrora foi um esboço da investigação.

Agradecimentos

Queria deixar o meu agradecimento a toda a equipa da Clínica Universitária de Otorrinolaringologia pela grande disponibilidade com que me receberam. Agradeço particularmente ao Doutor Marco Simão que me orientou e motivou no desenvolvimento desta revisão; ao Professor Óscar Dias pela dinâmica que criou em torno da exposição dos nossos projetos, dando uma nova dimensão e valor aos nossos trabalhos; e ao Professor Doutor José Pratas Vital que, a par do Professor Carlos Lima, foi pioneiro na aplicação do transplante de mucosa olfativa no contexto da lesão medular traumática crónica. Os seus trabalhos foram a base e inspiração para o desenvolvimento desta breve revisão, tendo ainda a amabilidade de disponibilizar publicações recentes nesta área.

Concluo com um agradecimento pessoal e profundo aos meus pais, a quem devo cada passo dado neste percurso, e aos meus restantes familiares e amigos, por caminharem a meu lado.

Muito obrigada.

Bibliografia

- Antonic A, Sena ES, Lees JS et al (2013) Stem cell transplantation in traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *PLoS Biol* 11(12):e1001738.
- Ban DX, Ning GZ, Feng SQ et al (2011) Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats. *Regen Med* 6(6):707–720.
- Coutts, M., & Keirstead, H. S. (2008). Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 209(2), 368–77.
<http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.09.002>.
- Dietz, V. (2008). Ready for human spinal cord repair. *Brain* 131, 2240–2242.
- Dlouhy, B.J., Awe, O., Rao, R.C., Kirby, P.A., and Hitchon, P.W. (2014). Autograft-derived spinal cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient: case report. *J. Neurosurg. Spine* 21, 618–622.
- Duan, D. and Lu, M. (2015). Olfactory mucosa: a rich source of cell therapy for central nervous system repair. *Rev. Neurosci.* 26, 281–293.
- Escada, P. (2010). *Autotransplantação de Células Estaminais Olfativas no Tratamento das Lesões Traumáticas Crônicas da Medula Espinal*. Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências Médicas.
- Franssen, E. H. P., de Bree, F. M., & Verhaagen, J. (2007). Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Research Reviews*, 56(1), 236–58. <http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.013>
- Ge, L., Liu, K., Liu, Z., & Lu, M. (2015). Co-transplantation of autologous OM-MSCs and OM-OECs: a novel approach for spinal cord injury. *Reviews in the Neurosciences*, 0(0). <http://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0030>
- Guérout, N., Paviot, A., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Genty, D., Jean, L., ... Marie, J.-P. (2011). Co-transplantation of olfactory ensheathing cells from mucosa and bulb origin enhances functional recovery after peripheral nerve lesion. *PloS One*, 6(8), e22816. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0022816>
- Guerout, N., Paviot, A., Bon-Mardion, N., Honoré, A., Obongo, R., Duclos, C., & Marie, J.-P. (2014). Transplantation of olfactory ensheathing cells to evaluate functional recovery after peripheral nerve injury. *Journal of Visualized*

- Experiments : JoVE*, (84), e50590. <http://doi.org/10.3791/50590>
- Lima, C., Pratas-Vital, J., Escada, P., Hasse-Ferreira, A., Capucho, C., & Peduzzi, J. D. (2006). Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 29(3), 191–206.
- Lindsay, S. L., Johnstone, S. a., Mountford, J. C., Sheikh, S., Allan, D. B., Clark, L., & Barnett, S. C. (2013). Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia*, 61(3), 368–382. <http://doi.org/10.1002/glia.22440>
- Ma, Y.-H., Zhang, Y., Cao, L., Su, J.-C., Wang, Z.-W., Xu, A.-B., & Zhang, S.-C. (2010). Effect of neurotrophin-3 genetically modified olfactory ensheathing cells transplantation on spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 19(2), 167–77. <http://doi.org/10.3727/096368910X492634>
- Mackay-Sim, A. and St John, J.J.A. (2011). Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries. *Exp. Neurol.* 229, 174–180.
- Mayeur, A., Duclos, C., Honoré, A., Gauberti, M., Drouot, L., do Rego, J.-C., ... Guérout, N. (2013). Potential of Olfactory Ensheathing Cells from Different Sources for Spinal Cord Repair. *PLoS ONE*, 8(4), e62860. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062860>
- Nicolas G, Robin JMF, Nick DJ (2014) Cell therapy for spinal cord injuries: what is really going on? *Neuroscientist* 1:1–16
- Novikova, L. N., Lobov, S., Wiberg, M., & Novikov, L. N. (2011). Efficacy of olfactory ensheathing cells to support regeneration after spinal cord injury is influenced by method of culture preparation. *Experimental Neurology*, 229(1), 132–42. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.09.021>
- Paviot, A., Guérout, N., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Jean, L., Boyer, O., & Marie, J.-P. (2011). Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells. *Neurobiology of Disease*, 41(3), 688–94. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.12.004>
- Raisman, G. (2007). Repair of spinal cord injury by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Comptes Rendus Biologies*, 330(6-7), 557–560. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2007.03.010>
- Richter, M. W., & Roskams, A. J. (2008). Olfactory ensheathing cell transplantation following spinal cord injury: Hype or hope? *Experimental Neurology*, 209(2), 353–367. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.011>

- Sasaki, M., Lankford, K. L., Radtke, C., Honmou, O., & Kocsis, J. D. (2011). Remyelination after olfactory ensheathing cell transplantation into diverse demyelinating environments. *Experimental Neurology*, 229(1), 88–98.
<http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.010>
- Wang, G., Ao, Q., Gong, K., Zuo, H., Gong, Y., and Zhang, X. (2010). Synergistic effect of neural stem cells and olfactory ensheathing cells on repair of adult rat spinal cord injury. *Cell Transplant.* 19, 1325–1337.
- Watsuki, K. I., Ajima, F. T., Hnishi, Y. O., Akamura, T. N., Shihara, M. I., Osomi, K. H., ... Oriwaki, T. M. (2016). Chronic Complete Spinal Cord Injury.
<http://doi.org/10.2176/nmc.oa.2015-0320>
- Zhang, J., Liu, Z., Chen, H., Duan, Z., Zhang, L., Chen, L., & Li, B. (2015). Synergic Effects of EPI-NCSCs and OECs on the Donor Cells Migration, the Expression of Neurotrophic Factors, and Locomotor Recovery of Contused Spinal Cord of Rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(3), 760–769.
<http://doi.org/10.1007/s12031-014-0416-2>

Muscle Function Grading

- 0** = total paralysis
- 1** = palpable or visible contraction
- 2** = active movement, full range of motion (ROM) with gravity eliminated
- 3** = active movement, full ROM against gravity
- 4** = active movement, full ROM against gravity and moderate resistance in a muscle specific position.
- 5** = (normal) active movement, full ROM against gravity and full resistance in a muscle specific position expected from an otherwise unimpaired person.
- 5*** = (normal) active movement, full ROM against gravity and sufficient resistance to be considered normal if identified inhibiting factors (i.e. pain, disuse) were not present.
- NT** = not testable (i.e. due to immobilization, severe pain such that the patient cannot be graded, amputation of limb, or contracture of >50% of the range of motion).

ASIA Impairment (AIS) Scale

- ☐ **A = Complete.** No sensory or motor function is preserved in the sacral segments S4-S5.
- ☐ **B = Sensory Incomplete.** Sensory but not motor function is preserved below the neurological level and includes the sacral segments S4-S5 (light touch, pin prick at S4-S5: or deep anal pressure (DAP)), AND no motor function is preserved more than three levels below the motor level on either side of the body.
- ☐ **C = Motor Incomplete.** Motor function is preserved below the neurological level^{**}, and more than half of key muscle functions below the single neurological level of injury (NLI) have a muscle grade less than 3 (Grades 0-2).
- ☐ **D = Motor Incomplete.** Motor function is preserved below the neurological level^{**}, and at least half (half or more) of key muscle functions below the NLI have a muscle grade ≥ 3 .
- ☐ **E = Normal.** If sensation and motor function as tested with the ISNCSCI are graded as normal in all segments, and the patient had prior deficits, then the AIS grade is E. Someone without an initial SCI does not receive an AIS grade.

^{**}For an individual to receive a grade of C or D, i.e. motor incomplete status, they must have either (1) voluntary anal sphincter contraction or (2) sacral sensory sparing with sparing of motor function more than three levels below the motor level for that side of the body. The Standards at this time allows even non-key muscle function more than 3 levels below the motor level to be used in determining motor incomplete status (AIS B versus C).

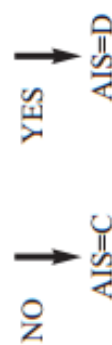
NOTE: When assessing the extent of motor sparing below the level for distinguishing between AIS B and C, the *motor level* on each side is used, whereas to differentiate between AIS C and D (based on proportion of key muscle functions with strength grade 3 or greater) the *single neurological level* is used.

Steps in Classification

The following order is recommended in determining the classification of individuals with SCI.

1. Determine sensory levels for right and left sides.
2. Determine motor levels for right and left sides.
Note: in regions where there is no myotome to test, the motor level is presumed to be the same as the sensory level, if testable motor function above that level is also normal.
3. Determine the single neurological level.
This is the lowest segment where motor and sensory function is normal on both sides, and is the most cephalad of the sensory and motor levels determined in steps 1 and 2.
4. Determine whether the injury is Complete or Incomplete.
(i.e. absence or presence of sacral sparing)
If voluntary anal contraction = No AND all S4-S5 sensory scores = 0 AND deep anal pressure = No, then injury is COMPLETE. Otherwise, injury is incomplete.
5. Determine ASIA Impairment Scale (AIS) Grade:
Is injury Complete? If YES, AIS=A and can record ZPP (lowest dermatome or myotome on each side with some preservation)
Is injury motor Incomplete? If NO, AIS=B
(Yes=voluntary anal contraction OR motor function more than three levels below the motor level on a given side, if the patient has sensory incomplete classification)

Are at least half of the key muscles below the single neurological level graded 3 or better?



If sensation and motor function is normal in all segments, AIS=E
Note: AIS E is used in follow-up testing when an individual with a documented SCI has recovered normal function. If at initial testing no deficits are found, the individual is neurologically intact; the ASIA Impairment Scale does not apply.

⁴ Anexo disponível em “http://www.asia-spinalinjury.org/elearning/ASIA_ISCOS_high.pdf”.